

## トキソプラズマ色素試験の基準化に関する研究 (2)

### Accessory factor としての血漿の使用について

小林 昭夫 熊田 三由

国立予防衛生研究所寄生虫部

常松 之典

東京大学医科学研究所細菌感染研究部

(1968年1月23日 受領)

先きに著者ら(小林ら, 1967)は, 色素試験に用いられる Accessory factor (以下 AF と略)として, 原法(Sabin & Feldman, 1948)あるいは米国標準法(Sabin et al., 1952)のごとく血清を使用した場合, 感染マウスの腹水の性状とも関連して AF 血清自体にもとづく非特異的反応が著明に出現することのあることを指摘し, さらに, 抗凝固剤なかんづく Alsever 液または 0.15M クエン酸緩衝液 (pH 5.3) を反応系中 6% の割合に添加することによって, 本来の抗原・抗体反応を阻止することなく上記の非特異反応を抑制し, 結果として成績の再現性をいちじるしく高めうることを報告した。

しかし, もし AF 血清を用い, 反応系中に抗凝固剤を加えるかわりに, 抗凝固剤を用いてえられる血漿そのままを AF として用いても同様の好結果がえられるのであれば, 操作はより簡易化されるはずである。血漿が AF として充分使用しえられることは, 経験的には既に知られている (Jacobs & Lunde, 1961—私信)。

そこで以下, AF としての血漿の有用性について検討を加え, さらに著者らの術式による色素試験成績が, 米国立衛生研究所 (NIH) のそれと一致するものであるか否かを検討してみた。

#### 材料および方法

##### 1. 陽性対照血清および被検血清

陽性対照血清としては, 前報と同様 RH 株感染豚から得た血清を用いた。被検血清としては, ヒト, ブタ, ウサギ等の血清を用いた。これらの血清は, いずれも 56°C, 30 分間の加熱により非働化した後実験に供した。

##### 2. Accessory factor

前報と同様, 3名の供血者 (KY. TY. SM) から得た血清および血漿を用いた。

血漿は, 全血 87 容に対して Alsever 液 (処方: ブドウ糖 2.45 g, クエン酸 0.8 g, クエン酸ナトリウム 2.2 g, 蒸溜水 100 ml) 13 容の割合に混合し, 直ちに, 5°C, 3,000 rpm, 30 分間の遠心によって得られたものである。

##### 3. トキソプラズマおよびトキソプラズマ・AF 浮游液

RH 株接種 3 日目のマウスの腹腔内に生食水 2 ml を注入し注射器のピストンを逆に引いてえられる腹水を一旦遠心 (1,500 rpm, 2 分間) して液状部分を除去し, その沈渣に 80% AF・生食水を加えてトキソプラズマ・AF 浮游液を作成した。ただし AF として血清を使用し Alsever 液を添加する場合は, あらかじめ Alsever 液を AF 血清と混じたもの (AF 血清 80%, Alsever 液 12%, 生食水 8% の割合) を虫体に加えてトキソプラズマ・AF 浮游液をつくった。

第1表 AF としての血清および血漿の有効濃度

AF	AF 終末濃度	陽性血清各種積倍における 被染虫体百分比			
		1,024	4,094	16,384	生食水
血 清	40%	1	2	31	45
	30	1	1	72	73
	20	3	10	86	92
	10	80	80	93	95
血 清 Alsever 添加	40	1	28	86	90
	30	1	47	90	91
	20	22	62	94	96
	10	89	90	92	95
血 漿	50	1	45	88	91
	40	1	45	89	92
	30	27	59	90	91
	20	69	84	93	96
	10	84	86	94	96
対照(生食水)		98	100	100	100

本研究は厚生科学研究費の補助によって行なわれた。記して謝す。

第2表 AFとしての Alsever 添加血清と血漿の比較ならびに予研・NIH 間の盲目比較色素試験

被 検 血 清	国立予防衛生研究所				米国立衛生研究所(NIH)
	AF血清・Alsever		AF血漿		AF血漿
	I	II	I	II	
1 ヒ ト	<16	<16	<16	<16	<16
2 ヒ ト	64	64	64	64	64
3 ヒ ト	64	64	64	64	64
4 ヒ ト	256	512	256	256	256
5 ヒ ト	256	256	256	256	512
6 ヒ ト	1,024	1,024	512	1,024	1,024
7 ヒ ト	1,024	1,024	512	1,024	1,024
8 ブ タ	4,096	4,096	4,096	4,096	4,096
9 ブ タ	16,384	16,384	16,384	16,384	16,384
10 ウサギ	65,536	65,536	65,536	65,536	32,768

表中の数値は色素試験抗体価(倍)をしめす

#### 4. 方法

色素試験の術式は前報(小林ら, 1967)のそれに準じておこなった。

### 成 績

#### 1. Alsever 添加血清法と血漿法の比較

まずAFとしての血漿の有用性とその有効下限濃度を検するため、同一の供血者(KY)から得た血清と血漿とをそれぞれ用いて色素試験をおこない、その結果を比較した。

AFとして血清を使用する場合は、これに Alsever 液の添加および非添加の2通りとした。

反応系中におけるAF血清の濃度は40%, 30%, 20%, 10%とし、AF血漿使用の場合のそれは50%, 40%, 30%, 20%, 10%とした。AF使用に対する対照としてはAFのかわりに生食水を用いた。

結果は第1表にしめすように、AFの欠如した生食水対照においては、陰性・陽性両対照ともほとんど全ての虫体が被染性をしめし、抗原・抗体反応の成立は全くみとめられなかった。

AF血漿使用時例では、終末濃度 50%, 40% において満足すべき成績、すなわち陰性対照において 90% 以上の被染率、陽性対照において所定の抗体価 1:4,096 がしめされた。

一方 Alsever 加AF血清使用においては、血清濃度 40% と 30% において好結果がえられた。

Alsever 非添加、血清単独使用時例では、従来一般におこなわれてきた濃度 40% では結果がわるく、陰性対照においてわずか 45% の虫体被染率をしかしめさなかったことは前報における実験結果と同一の傾向となっている。しかしこの場合、AF濃度 40% 以下においては、濃度の減少とともに陰性対照における虫体の被染率は増

加し、とくに 20% 濃度では、陰性・陽性対照とも良好な結果がえられたことは注目すべき事実である。この点については後にもふれる。

以上の成績からすれば、AFとして血清を使用し Alsever 液を添加する方法(Alsever 加血清法)でも血漿を用いる方法(血漿法)でも、そのAF終末濃度を40%とした場合は適正な結果がえられるものと考えられる。

そこで次にAFとしての血清、血漿ともに終末40%とした場合における Alsever 加血清法と血漿法とを10種の被検血清(ヒト血清7, ブタ血清2, ウサギ血清1)について応用し、その結果について比較した。AFとしては同一供血者(KY)のものをそれぞれ使用した。その結果は第2表にしめしたとおりである。

この表には、各法とも日を変えてのくり返し試験の結果がしめしてあるが、いずれの方法によった場合にも両実験回の成績はよく一致し、Alsever 加血清法では被検血清の抗体価の完全一致をみたもの 10 例中 9 例、また血漿法では 10 例中 8 例に達している。

第3表 3種のAF血漿使用時における色素試験抗体価の比較

被検血清	各AF血漿使用時における色素試験抗体価		
	KY	TY	SM
1 ヒ ト	16	16	16
2 ヒ ト	16	16	16
3 ヒ ト	16	16	64
4 ヒ ト	64	64	64
5 ヒ ト	64	64	64
6 ヒ ト	64	64	64
7 ヒ ト	64	64	64
8 ブ タ	256	1,024	1,024
9 ブ タ	1,024	256	256
10 ブ タ	1,024	1,024	1,024
11 ブ タ	4,096	4,096	4,096
12 ブ タ	4,096	4,096	4,096
13 ウサギ	4,096	4,096	4,096



第4表 本邦成人における色素試験抗体価別分布

抗体価	妊婦	血液銀行 供血者	保健所 職員	と 従業員	合計
1:4>	199(73.4%)	82(69.5%)	30(44.1%)	31(33.3%)	342(62.2%)
1:4	8(3.0%)	7(5.9%)	5(7.4%)	7(7.5%)	27(4.9%)
1:16	35(12.9%)	18(15.3%)	27(39.7%)	26(28.0%)	106(19.3%)
1:64	26(9.6%)	8(6.8%)	4(5.9%)	26(28.0%)	64(11.6%)
1:256	3(1.1%)	3(2.5%)	2(2.9%)	2(2.2%)	10(1.8%)
1:1024	0	0	0	1(1.0%)	1(0.2%)
計	271	118	68	93	550
陽性(1:16≤)	64(23.6%)	29(24.6%)	33(48.5%)	55(59.1%)	181(32.9%)

また両方法間の成績の一致率も高く、とりわけ *Alsever* 加血清法における実験Ⅰと血漿法による実験Ⅱにおいては被検血清の全てにおいて抗体価の完全な一致をみている。

## 2. 三種AF血漿使用による反応比較

さきの実験で供血者KYの血漿がAFとして十分用いえることがわかったので、さらに他の供血者について、その血漿の有用性をしらべてみた。

AF血漿として、KY、TY、SMの3種を用い、13種の被検血清(ヒト血清7、ブタ血清5、ウサギ1)について色素試験をおこなった。なお試験は2回にわたっておこない、それぞれKY血漿使用、TYおよびSM血漿使用とした。成績は第3表にしめすとおりである。

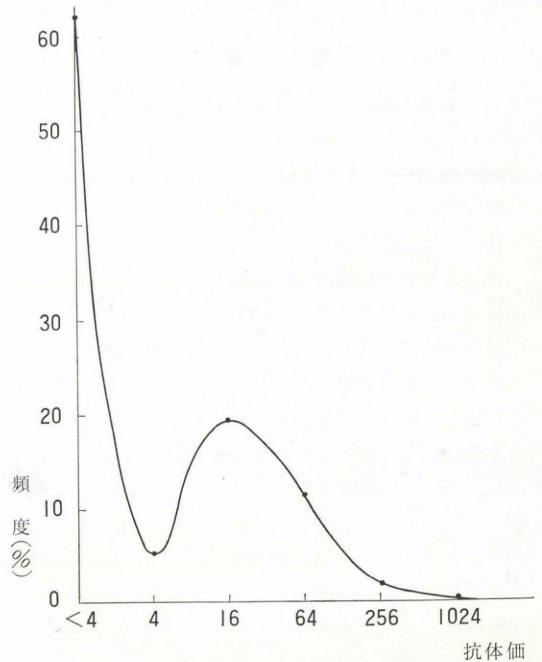
表にみるように、3種AF血漿使用時につき、被検血清の抗体価の完全一致をみたものは13例中10例に達した。なお不一致をしめた3例(No. 3, 8, 9)においても4倍稀釈倍で1管の差がしめされたに過ぎなかった。

## 3. 正常人における抗体価別度数分布

血漿法による反応の信頼性を検するため、妊婦271名、血液銀行を訪れる供血者118名、保健所職員68名、と場従業員93名、合計550名の成人について同法により色素試験を実施し、各抗体価別の度数分布をもとめてみた。その結果をしめたものが第4表および第1図である。

第4表にみるように、いずれの被検者群においても、抗体価別の頻度は、抗体価1:4におけるそれを谷間として2つのピークとしてしめされている。ピークの1つは1:4以下におけるそれであり、他は1:16におけるそれとなっており、1:4における頻度は被検者群によって若干の差はあるが、3.0~7.5% 平均4.9%であった。

以上の成績から判断して、実際上は1:4以下は陰性、1:16以上はこれを陽性反応群と見做したい。それらの中間値1:4は、いわゆる疑陽性と考えることができる。



第1図 普通成人550名についての抗体価別分布

したがってこのような方法によるかぎり、反応の陽性判定基準としては1:16≤を採用すべきであることは明らかであり、そうした判定基準によった場合の各被検者群の陽性率をもとめてみると、妊婦23.6%、供血者24.6%、保健所職員48.5%、と場従業員59.1%、平均32.9%となった。

## 4. 国立予防衛生研究所、米国国立衛生研究所(NIH)間における盲目比較色素試験

*Alsever* 加血清法と血漿法による著者らの色素試験が十分信頼しうるものであるか否かを知るためには、国際的な比較が必要である。

そこで10種の血清(ヒト血清7、ブタ血清2、ウサギ血清1)を米国NIHのJacobs博士の研究室に送り、

彼我の研究室において色素試験を実施し、得られた成績を照合、検討した。NIHにおける色素試験の術式は血漿法によった。成績は第2表にみるとおりである。

すなわち、著者らの実施した *Alsever* 加血清法、血漿法と NIH における血漿法とは、きわめてよく一致した成績をしめし、とくに前記 *Alsever* 加血清法による実験 I、血漿法による実験 II の成績と NIH の成績との間では、被検血清 10 例中 8 例において抗体価の完全な一致をみ、不一致をみた 2 例 (No. 5, 10) についても抗体価において 2 倍の差をみたに過ぎなかった。

## 論 議

以上の実験成績により、AF 血清自体にもとずくいわゆる非特異的反応の発現を抑制するためには、AF 血清に *Alsever* 液の一定量を添加するか、あるいはそうした抗凝固剤を用いてえられる血漿を用いれば十分その目的が達せられることが証明された。

一方 AF 血清を抗凝固剤の添加なしに単独で用いた場合は、その終末濃度を規定の 40% とした場合には、前報の場合と同様、AF 血清自体による非特異的な抗トキソプラズマ作用の発現のため良い結果がえられなかった。

しかしこのような AF 血清でも、終末濃度を 20% とした場合には、今回の 1 回の実験結果からは良い結果がえられている。同様の事実は、すでに Goldman (1962) もみとめているが、こうした AF 血清稀釈法の得失については稿を改め別の機会に報告したい。

血漿を用いる上記の術式による一般成人における色素試験成績によれば、先述のごとく、1:4 を頻度分布の谷間として、陰性、陽性両反応群が明確に区別され、1:16 以上を陽性として採択してよいとする Sabin et al. (1952) の見解と完全に一致し、また普通人における抗体価は、せいぜい 1:64 までの範囲だとする同氏らの成績ともほぼ合致する。

*Alsever* 加血清法および血漿法によった場合の著者らの色素試験成績は、米国 NIH によるそれとよく一致することが実証された。血漿法を採用した場合の成人陽性率は被検者群によってかなり異なり、最低 23.6%、最高 59.1%、平均 32.9% であった。

こうした陽性率は、同一の陽性判定基準 (1:16 $\leq$ ) に従った場合の本邦諸家 (長谷川ら, 1954; 常松ら, 1958; 清水ら, 1958) による成人陽性率 6~7% をはるかに凌駕する。また、堀本 (1958) は、成人における一般陽性率は 6.8% であったと報告しているが、この場合の陽性判定

基準は 1:4 であり、1:16 以上の抗体価をしめた例はみとめられなかったことから、上記諸家とりわけ堀本による色素試験の反応様式は、著者らのそれといちじるしく異なるものであると考えることができる。なお AF としての血漿の有用性については、最近 Payne (1966) もこれを指摘している。

*Alsever* 加血清法と血漿法の優劣については、未だ十分評価できる段階ではないが、少なくとも操作の簡易性という点からすれば血漿法の方がやや勝れるといえる。しかし、血漿法では、マウスの腹水あるいは腹水中の虫体側の不明の因子により、きわめて稀にはあるが、使用腹水バッチにより、虫体の完全崩壊をきたし、ために反応を不成立に至らしめることのあることを著者らは経験しており、この点については血漿法の欠点であるといえる。この場合、同一の虫体材料を用いた *Alsever* 加血清法では、そうした虫体の崩壊はみられなかったが、血漿法を採用した場合に稀におこりうる、このような現象がいかなる原因にもとずくのか、現在のところ全く不明であり、将来解明さるべき興味ある問題をはらんでいる。

## 要 約

AF 血清中にみとめられる、いわゆる非特異的抗トキソプラズマ作用物質の発現防止の目的には、血清に一定量の抗凝固剤なかつく *Alsever* 液を添加するとよい (小林ら, 1967) が、*Alsever* 液を用いて得られる血漿を AF として、終末濃度 40~50% として用いても同様に有効である。

一般成人 550 名につき、血漿を用いておこなった場合の色素試験抗体価別の頻度分布は、抗体価 1:4 を谷間とし、1:4 $>$  と 1:16 をピークとする 2 峯性をしめし、その結果から陽性判定基準としては 1:16 を採用すべきであると結論された。

これらの方法を応用してえられる色素試験成績は、米国国立衛生研究所 (NIH) によるそれときわめてよく一致する。

終りに本稿の校閲をして下さった予研究生虫部長石崎達博士に深謝する。また盲目比較試験に協力された米国 NIH 寄生虫部の Jacobs 博士ならびに Lunde 氏に深く感謝する。



## 文 献

- 1) Goldman, M. (1961) : Siim の Pathogenetic aspects of human acquired toxoplasmosis についての討論. *Survey of Ophthalmology*, 6, 796-797.
- 2) 長谷川秀治・常松之典・田中信男 (1954) : トキソプラズマの研究 I. 普通人及び動物のトキソプラズマ抗体保有率について. *日本細菌誌*, 9, 455-458.
- 3) 堀本豊信 (1958) : 色素試験及び皮内反応に依るトキソプラズマ症の研究. *阪市大医誌*, 7, 1018-1039.
- 4) 小林昭夫・熊田三由・常松之典 (1967) : トキソプラズマ色素試験の基準化に関する研究 (1). 反応に及ぼす抗凝固剤の影響. *寄生虫誌*, 16, 494-503.
- 5) Payne, R. A. (1966) : The effect of citrate radical on the dye test for toxoplasmosis. *Monthly Bull. Ministry of Health & Pub. Health Lab. Service*, 25, 161-164. (*Trop. Diseases Bull.*, 64, 103, 1967 より引用)
- 6) Sabin, A. B. and Feldman, H. A. (1948) : Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science*, 108, 660-663.
- 7) Sabin, A. B., Eichenwald, H., Feldman, H. A. & Jacobs, L. (1952) : Present status of clinical manifestations of toxoplasmosis in man. *J. A. M. A.*, 150, 1063-1069.
- 8) 清水文彦・橋本雅一・藤田光一郎・川上省三・小林勝・高山正三・吉野長康・染谷博・石川近美・岡本陽一郎・増田悦蔵・武藤十郎・甘粕繁四郎 (1958) : 正常人のトキソプラズマ抗体保有率について. *日本衛生誌*, 13, 173-177.

## Abstract

STANDARDIZATION OF THE DYE TEST FOR TOXOPLASMOSIS (2)  
ON THE USE OF PLASMA AS THE ACCESSORY FACTOR

AKIO KOBAYASHI AND MITSUYOSHI KUMADA

(*Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo*)

YUKINORI TSUNEMATSU

(*Department of Bacterial Infection, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo*)

In the previous paper (Kobayashi *et al.* 1967) the authors demonstrated that the non-specific modification of toxoplasmas due to accessory factor sera could well be minimized by the addition of certain anticoagulants such as Alsever or 0.15M citrate buffer solution (pH 5.3) to the reaction mixture.

In this paper, results of a comparison between the serum and plasma as the accessory factor for the dye test are described. Plasmas were obtained from donors after the whole blood was mixed with Alsever. An accessory factor serum was used together with Alsever.

Results indicate that the plasma can be successfully used as the accessory factor when applied at concentrations of 40-50% in the reaction mixture. No significant differences were observed between both applications of Alsever-added serum and plasma in the test. The favorable effect of the plasma was attributed to the presence of Alsever in it. Three different accessory factor plasmas available at our hands were proved to possess similar potencies in the reaction.

A blindfold comparative dye test on 10 sera between NIH of U. S. A. and our laboratories resulted in an excellent agreement in their titers.